

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/DE00/02758

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, Susan POTTS BA ACIS

Director to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare:

That the translator responsible for the attached translation is knowledgeable in the German language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of RWS Group plc knowledge and belief, the English translation of the amended sheets of the international application No. PCT/DE00/02758 is a true and complete translation of the amended sheets of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: January 22, 2002

Signature of Director :



For and on behalf of RWS Group plc

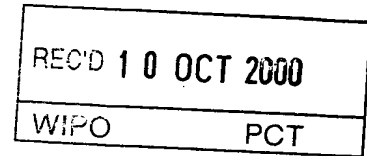
Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10-049693

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

DE 00/02758

Aktenzeichen: 199 38 138.0

Anmeldetag: 16. August 1999

Anmelder/Inhaber: november AG Novus Medicatus Bertling
Gesellschaft für Molekulare Medizin,
Erlangen/DE

Bezeichnung: Verfahren und Vorrichtung zur Identifi-
kation einer Biopolymersequenz auf Fest-
körperoberflächen

IPC: C 12 Q, C 12 M

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert



1

Verfahren und Vorrichtung zur Identifikation einer Biopolymersequenz auf Festkörperoberflächen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur
5 Identifikation einer spezifischen Biopolymersequenz, die auf
einer Festkörperoberfläche gebunden ist.

Aus der US 5,780,234 ist bekannt, daß Nukleinsäuren, an die
kovalent Donator- und Akzeptorgruppen als Elektronentrans-
10 fereinheiten angebracht sind, eine extrem schnelle und lang-
reichweitige Elektronenleitung aufweisen können. Werden diese
Elektronentransfereinheiten an zwei komplementären Nuklein-
säuren angebracht, kann diese Methode auch zur Detektion der
Hybridisation eingesetzt werden.

15

In der US 5,780,234 wird auch die Möglichkeit genannt, Elek-
trodenoberflächen als eine der Elektronentransfereinheiten zu
verwenden.

20 Die in DNA-Einzel- und Doppelsträngen auftretenden Leitfähig-
keitsphänomene wurden in zahlreichen Arbeiten eingehend un-
tersucht. So untersuchten H.-W. Fink et al. [H.W. Fink, C.
Schönenberger, Nature 398, 407 (1999)] sowohl die Leitfähig-
keit von DNA-Molekülen, als auch den Einfluß elektroaktiver
25 Gruppen. Die an einzelnen DNA-Doppelsträngen gemessenen Leit-
fähigkeiten wurden in der Größenordnung guter Halbleiter oder
leitfähiger Polymere angegeben. Es wird jedoch auch auf die
zum Teil noch eklatanten Diskrepanzen zwischen verschiedenen
experimentellen Befunden und theoretischen Vorhersagen hinge-
30 wiesen.

Hohe Leitfähigkeit und schneller Ladungstransfer auch über große Abstände wurde auch an Monolagen von DNA-Doppelsträngen auf Elektrodenoberflächen gemessen [S.O. Kelley, N.M. Jackson, M.G. Hill, J.K. Barton, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 38, 941 (1999)]. Einzelne Mismatches in der Basensequenz der Doppelhelices können diesen Ladungstransport allerdings entscheidend behindern. Dies legt nahe, daß durch elektronische Detektion der DNA-Hybridisation eine hohe Spezifizität und Sensitivität auch auf einzelne Punktdefekte erreicht werden kann.

Aufgabe dieser Erfindung ist es, eine neue Technologie bereitzustellen, die es ermöglicht, an eine feste Oberfläche fixierte Biopolymere eindeutig und sensitiv zu identifizieren.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale des Anspruchskomplexes einzeln oder in Kombination gelöst.

Unter Biopolymer wird insbesondere ein aus Nukleotiden oder Aminosäuren gebildetes Polymer verstanden, z.B. DNA, RNA, PNA, PTO, Peptid, Protein u.dgl..

Die Identifikation wird durch eine hierzu affine Biopolymersequenz vorgenommen, die sowohl in Lösung, als auch auf einer zweiten Festkörperoberfläche vorliegen kann. Die Detektion kann über elektronische und optische Verfahren erfolgen.

Die elektronische Detektion durch z.B. bei der Hybridisation auftretenden Leitfähigkeitsänderung zwischen zwei oder an einer Oberfläche sowohl im Bezug auf Sensitivität, Spezifizität und apparative Umsetzung bietet entscheidende Vorteile.

Mögliche Einsatzfelder der hier entwickelten Methode können eine große Bandbreite von der medizinischen Diagnostik bis hin zur Identifikations-, Codierungs- und Erkennungstechnik umfassen.

Die erfindungsgemäße Identifikation der Biopolymere auf einer Festkörperoberfläche erfolgt vorteilhafterweise nach folgender Vorgehensweise:

10

a) Die auf der Festkörperoberfläche fixierten (ersten) Biopolymere werden mit dazu affinen (zweiten) Biopolymeren in Kontakt gebracht, was eine spezifische Reaktion (bei Nukleinsäuren eine Hybridisation zu Doppelsträngen) zur Folge hat. Die zweiten Biopolymere können sich sowohl in Lösung befinden, als auch auf einer Gegenoberfläche fixiert sein, die z.B. durch Aufeinanderpressen mit den zu identifizierenden Molekülen in Kontakt gebracht wird.

15

b) Die Hybridisation kann dann über eine Änderung in der Oberflächenleitfähigkeit oder der Leitfähigkeit im Bezug auf eine Gegenelektrode gemessen werden, wenn sich die zweiten Biopolymere bzw. Zielbiopolymere in Lösung befinden. Wenn die Hybridisation zwischen zwei parallelen Oberflächen erfolgt, kann die Änderung in der Leitfähigkeit zwischen den beiden Oberflächen zur Detektion verwendet werden. Dies gilt in beiden Ausgestaltungsformen sowohl für AC- und DC-Leitfähigkeitsphänomene. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit können in den biopolymeren Dünnfilm auch Metallatome, -Ionen, -Cluster und Komplexmoleküle eingelagert werden. Alternativ kann die Detektion auch über Fluoreszenz oder andere optische

25

30

Methoden erfolgen. Leitfähige Cluster können hier auch zur Verstärkung optischer Signale eingesetzt werden.

In einer Ausgestaltungsform werden als zu identifizierende Biopolymere bzw. erste Biopolymere Nukleinsäuren einer bestimmten Sequenz kovalent an eine leitfähige Festkörperoberfläche gebunden. Hierzu komplementäre Nukleinsäuren sind an ein zweites leitfähiges Substrat gebunden, das mit dem ersten durch Aufeinanderpressen in Kontakt gebracht wird. Findet Hybridisation der Nukleinsäuren zwischen den beiden Oberflächen statt, wird dies eine wesentliche Verringerung des elektrischen Widerstandes zur Folge haben, was durch konventionelle elektronische Methoden problemlos nachweisbar ist. Durch die mit der Hybridisation verbundenen Änderungen der Kapazitäten in dieser Schichtstruktur werden auch veränderte Wechselstromwiderstände detektierbar. Weiterhin ist auch der Einsatz elektrochemischer Signale, wie z.B. spezifischer Reduktions- und Oxidationspeaks zur Identifikation der Hybridisation einsetzbar.

Eine ähnliche Nachweismethode ist auch einsetzbar, wenn die Zielbiopolymere in Lösung vorliegen. Auch hier ist der Nachweis der Hybridisation über elektronische Meßgrößen möglich. Bevorzugt kann hier die Änderung in der Doppellagenkapazität auf der Oberfläche über AC- und/oder Impedanzsignale nachgewiesen werden. Dies kann entweder über eine Gegenelektrode erfolgen, oder aber über die strukturierte Ausgestaltung der Detektoroberfläche. Letzteres kann in einer Aufteilung der Oberfläche in zwei leitfähige und von einer Isolatorfläche getrennte Teilflächen erfolgen, von denen eine die nachzuweisenden Nukleinsäuren trägt und die andere als Gegenelektrode dient. Auch eine Dreiteilung zur Schaffung einer zusätzlichen Referenzelektrode für einen elektrochemischen Dreielektroden-

- setup ist möglich. Die Elektroden können auch zu einer Anreicherung geladener Zielmoleküle in der Nähe der Oberfläche genutzt werden. In einer speziellen Ausgestaltungsform kann auch eine Anreicherung und Detektion auf der Oberfläche erreicht werden, indem eine Wechselspannung oder ein Wechselstrom zwischen zwei Elektroden, die sich in einem kleinen Abstand zueinander befinden und auf denen jeweils die zu detektierenden Moleküle fixiert sind, angelegt wird.
- 10 Die elektronischen Meßgrößen können verstärkt werden, indem in den Dünnsfilm der zu detektierenden Biopolymere Metallatome, -Cluster oder -Ionen eingebracht werden. Dies kann sowohl vor als auch nach der Hybridisierung z.B. durch Bedampfen oder elektrochemische Methoden erfolgen. Weiterhin ist auch
- 15 der Einsatz von Komplexen Molekülen, die sich z.B. bei Nukleinsäuren spezifisch an einzelsträngige Strukturen oder auch beispielsweise als Interkalatoren an doppelsträngige Konformationen anlagern und elektroaktive Zentren aufweisen.
- 20 Mögliche Anwendungen der hier beschriebenen Methoden können zum Beispiel im Falle der Hybridisation zwischen zwei Festkörperoberflächen im Bereich der Sicherheitstechnik in der fälschungssicheren Identifikation von Banknoten, Chipkarten, Ausweisen u.ä. liegen. Im Falle der Detektion in flüssiger
- 25 Phase kann die Detektionsmethode zur Identifikation z.B. von Chargen von Lebensmitteln, Medikamenten o.ä. eingesetzt werden.

Beispiel 1:

- 30 Oligonukleotide einer Länge von 21 Basen werden am 5'-Ende kovalent an die Oberfläche eines leitfähigen Polykarbonat/Kohlefaser-Kunststoffes fixiert. Die an der Oberfläche

befindlichen Oligonukleotide werden mit in Lösung befindlichen komplementären Sonden hybridisiert. Wird zwischen der leitfähigen Kunststoffoberfläche und einer Ag/AgCl-Gegenelektrode eine Wechselspannung einer Frequenz von 250 Hz angelegt und der kapazitive Anteil des Wechselstromes gemessen, so ergibt sich bei Hybridisation bei 0,4V ein Abfall der Wechselstromleitfähigkeit um mehr als 10%, was einer direkten Detektion einer spezifischen Hybridisierung und damit der zu ermittelnden Sequenz gleichkommt. Kontrollversuche mit nicht spezifischen Oligonukleotiden ergeben keine wesentliche Leitfähigkeitsänderung.

Beispiel 2:

Durch Aldehyd-Gruppen aktivierte Agarose-Beads werden mit Oligonukleotiden kovalent gekoppelt und auf eine Glasoberfläche immobilisiert. Die Oberfläche wird mit einer Testlösung in Kontakt gebracht, die dazu komplementäre Oligonukleotide enthält, die an einem Ende eine fluoreszierende FAM-Gruppe und am anderen Ende eine fluoreszenzunterdrückende dT(C2-Dabcyl)Phosphatgruppe enthalten. Weiterhin nehmen diese Nukleinsäuren aufgrund ihrer teilweise selbstkomplementären Basensequenz in Lösung eine haarnadelförmige Sekundärstruktur ein. Fluoreszierende und fluoreszenzunterdrückende Gruppen befinden sich in unmittelbarer räumlicher Nähe. Bei Hybridisation mit den an der Oberfläche fixierten Nukleinsäuren entfaltet sich die Sekundärstruktur der in Lösung befindlichen Nukleotide und es wird eine starke Erhöhung der optischen Signalintensität meßbar.

Anspruchskomplex

Schutz wird beansprucht für die folgenden Merkmale für sich genommen oder in Kombination:

5

Verfahren zur Identifikation eines auf einer ersten Oberfläche eines Festkörpersubstrats aufgetragenen ersten Biopolymers, wobei das erste Biopolymer mit einem dazu affinen zweiten Biopolymer in Kontakt gebracht wird.

10

Verfahren nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei sich das zweite Biopolymer sich auf einer zweiten Oberfläche oder in Lösung befindet.

15 Verfahren nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung eines elektronischen oder optischen Signals, insbesondere der Änderung der Leitfähigkeit im Gleichstrom und/oder Wechselstrombereich und/oder der Änderung der Impedanz in Abhängigkeit von der aufgeprägten Wechselspannungs- oder Wechselstromfrequenz ausgelöst durch affinitätsbedingte Adhäsion.

25 Verfahren nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Änderung der Leitfähigkeit zwischen zwei leitfähigen Festkörperoberflächen gemessen wird, an die jeweils zueinander affine Biopolymere adsorbiert sind.

30 Verfahren nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Detektion der oberflächenfixierten Biopolymere durch Reaktion mit in Lösung befindlichen affinen Biopolymeren und deren De-

tektion durch Fluoreszenz und/oder Fluoreszenzresonanz-Energietransfer herbeigeführt wird.

5 Verfahren nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei sich die zu identifizierenden Biopolymere in Lösung befinden und die Detektion durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer vorgenommen wird.

10 Verfahren nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Detektion durch die Messung optischer Signale vorgenommen wird.

15 Verfahren nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die optischen Signale durch leitfähige Cluster verstärkt werden, welche von der ersten die ersten Biopolymere tragenden Oberfläche durch eine Affinitäts- und/oder Spacerschicht getrennt sind.

20 Verfahren nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Detektion durch eine Wechselspannung oder einen Wechselstrom zwischen zwei leitfähigen, durch einen Isolator getrennten mit dem ersten Biopolymer versehen Strukturen vorgenommen wird.

25 Verfahren nach den vorhergehenden Merkmale, wobei in mindestens eine auf ein Substrat adsorbierte aus dem ersten oder zweiten Biopolymer gebildete Schicht elektroaktive Metallatome, -Ionen, -Cluster oder Komplexmoleküle eingebracht werden.

30 Verfahren nach den vorhergehenden Merkmale, wobei eine zusätzliche leitfähige Struktur als Referenzelektrode und/oder

eine zusätzliche leitfähige Struktur als Gegenelektrode eingesetzt wird.

5 Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei sich das zweite Biopolymer sowohl auf einer zweiten Oberfläche als auch in Lösung befindet.

10 Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung eines elektronischen oder optischen Signals, insbesondere der durch affinitätsbedingte Adhäsion ausgelösten Änderung der Impedanz, der Leitfähigkeit im Gleichstrom und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von der aufgeprägten Wechselspannungs- oder Wechselstromfrequenz.

20 Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Änderung der Leitfähigkeit zwischen zwei leitfähigen Festkörperoberflächen gemessen wird, an die jeweils zueinander affine Biopolymere adsorbiert sind.

25 Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Detektion der ersten oberflächenfixierten Biopolymere durch affinitätsbedingte Reaktion mit in Lösung befindlichen zweiten Biopolymeren und deren Detektion durch Fluoreszenz und/oder Fluoreszenzresonanz-Energietransfer herbeigeführt wird.

30 Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die ersten Biopolymere in Lösung sich befinden und die Detektion durch Fluoreszenzresonanz-Energietransfer vorgenommen wird.

02

10

Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Detektion durch die Messung optischer Signale vorgenommen wird, die durch leitfähige Cluster, welche von der ersten, die ersten Biopolymere tragenden Oberfläche durch eine Affinitäts- und/oder Spacerschicht getrennt sind, verstärkt werden.

Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei die Detektion durch eine Wechselspannung oder Wechselstrom zwischen zwei leitfähigen, durch einen Isolator getrennten Strukturen, an die jeweils spezifische Biopolymere adsorbiert sind, vorgenommen wird. wie oben

Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei in mindestens eine auf ein Substrat adsorbierte Schicht aus Biopolymeren elektroaktive Metallatome, -Ionen, -Cluster oder Komplexmoleküle eingebracht werden.

Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Merkmale, wobei eine zusätzliche leitfähige Struktur als Referenzelektrode und/oder eine zusätzliche leitfähige Struktur als Gegenelektrode eingesetzt wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)